



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/06, 5/10, A01K 67/027		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/12793 (43) Date de publication internationale: 2 mai 1996 (02.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01389 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1995 (20.10.95)		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 94/12598 21 octobre 1994 (21.10.94) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON [FR/FR]; 46, allée d'Italie, F-69007 Lyon 7 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SAMARUT, Jacques [FR/FR]; 169 bis, route de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR). PAIN, Bertrand [FR/FR]; 4 bis, place Bir-Hakeim, F-69003 Lyon (FR).			
(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: ACTIVE RETINOIC ACID FREE CULTURE MEDIUM FOR AVIAN TOTIPOTENTIAL EMBRYONIC CELLS

(54) Titre: MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EMBRYONNAIRES TOTIPOTENTES AVIAIRES, DEPOURVU D'ACIDE RETINOIQUE ACTIF

(57) Abstract

A culture medium for avian totipotential embryonic cells comprising an avian cell culture medium is disclosed. The culture medium is characterised in that it comprises elements complementary to said avian cell culture medium, the complementary elements being selected from the group which comprises cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in that it is substantially free of active retinoic acid. A method for culturing avian totipotential embryonic cells, and the resulting products, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant: les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogues de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinoïque actif. Elle concerne également un procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires et les produits pouvant être obtenus par ce procédé.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EMBRYONNAIRES TOTIPOTENTES AVIAIRES, DEPOURVU D'ACIDE RETINOIQUE ACTIF

5 La présente invention se rapporte à l'obtention de cellules ES d'oiseau, en particulier à un procédé de culture et à un milieu permettant la culture de ces cellules.

En effet, dans le cadre de la mise au point de technique de production de protéines recombinantes, le développement d'une technique 10 de transgénèse chez les oiseaux domestiques aura des retombées économiques extrêmement importantes dans deux applications majeures:

- 1. le développement de souches aviaires présentant des caractères génétiques déterminés (résistance à certaines maladies, performances de croissance, etc)
- 15 - 2. le développement de systèmes de production de protéines recombinantes dans l'albumen de l'oeuf.

L'industrie biotechnologique s'intéresse de plus en plus à la possibilité de produire des protéines d'intérêt dans des fluides biologiques ou des organismes (sang, lait, plantes, ...). La production de telles protéines 20 dans l'oeuf d'oiseau domestique constituera certainement dans cette voie une avancée technologique majeure pour plusieurs raisons:

25 - de nombreuses protéines de mammifères ne peuvent être produites en système mammifère car leur surabondance dans ces organismes présente des effets délétères (exemple: l'érythropoïétine qui chez le lapin induit des hyperglobulinémies pathologiques). Beaucoup de ces protéines d'intérêt ne présentent pas d'activité croisée avec celles des oiseaux, autorisant ainsi leur surproduction dans un organisme aviaire sans effet pathologique majeur;

30 - il est très vraisemblable que la commercialisation de protéines recombinantes produites chez des mammifères se heurtera à des problèmes sanitaires liés à la présence chez cette espèces d'organismes latents potentiellement pathogènes pour l'Homme (lentivirus, prions,...). Ce risque est très minime, pour ne pas dire quasiment inexistant, pour des agents pathogènes des oiseaux domestiques;

- l'oeuf constitue un "tissu" très dense en un petit nombre de protéines. Par exemple la protéine majeure de l'oeuf d'oiseau, l'ovalbumine représente 54 % des protéines du blanc d'oeuf, soit un poids sec moyen par oeuf de 2 grammes de matière sèche environ. On peut raisonnablement 5 imaginer produire par oeuf au moins 10% de cette masse en protéine recombinante. La rentabilité économique apparait très grande si l'on considère qu'une poule pond en moyenne 2 oeufs tous les trois jours, et cette rentabilité apparait très supérieure à celle de grands mammifères si l'on considère les coûts d'élevage bien moindres des oiseaux domestiques.
- 10 La réalisation d'oiseaux transgéniques est possible actuellement avec un coût extrêmement élevé à cause de sa très faible efficacité. En effet chez les oiseaux la technique de microinjection d'ADN dans l'oeuf est quasiment impossible. D'autre part l'utilisation du système des rétrovirus vecteurs, le seul système efficace à ce jour, reste complexe et se heurtera 15 certainement à une réticence de la part des industriels pour des raisons sanitaires.
- Une avancée très importante à la réalisation d'animaux transgéniques a été apportée chez la souris par le développement de la technologie des cellules ES.
- 20 Les cellules ES (pour Embryonic Stem cells) sont des cellules embryonnaires totipotentes capables de régénérer tous les tissus de l'embryon, y compris le tissu germinal, après leur injection dans des embryons très précoces. Ces cellules peuvent donc être considérées comme 25 des chevaux de Troie pour introduire de nouvelles informations génétiques dans le patrimoine génétique d'un animal. La possibilité de cultiver ces cellules à long terme *in vitro*, offre la possibilité d'exercer de nombreux contrôles avant leur implantation *in vivo*. D'autre part ces cellules peuvent être conservées de façon illimitée dans l'azote liquide, ce qui constitue une possibilité de stockage d'un patrimoine génétique.
- 30 L'utilisation de cellules ES constitue aujourd'hui chez les oiseaux domestiques la voie la plus prometteuse pour la réalisation efficace d'animaux transgéniques.

Des travaux récents d'un groupe canadien (R. Etches à la station de Guelph) ont suggéré que des cellules ES doivent exister dans l'embryon d'oiseau (Petitte et al., 1990). Ce groupe a réussi la transplantation de telles cellules dans des embryons, et par suite, la production d'animaux dont le patrimoine génétique est dérivé des cellules greffées. Cependant à ce jour la culture de ces cellules in vitro n'a pas pu être réussie ; par conséquent ces cellules n'ont pas pu être utilisées pour transférer de façon stable un transgène. C'est là un blocage majeur à l'exploitation de la technologie des cellules ES chez les oiseaux. Les cellules ES peuvent être caractérisées par trois types de critères essentiels :

- morphologie
- activité phosphatase alcaline endogène
- réaction avec des anticorps spécifiques d'un état de totipotence (ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3 notamment).

Aucune culture de cellules ES identifiées par l'ensemble de ces caractéristiques n'a pu être obtenue à ce jour.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant : les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches,

et en ce qu'il est实质iellement dépourvu d'acide rétinoïque actif.

De manière avantageuse, l'acide rétinoïque est实质iellement inactivé par des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA) présents dans le milieu.

En effet, les milieux employés contiennent souvent du sérum, dont on ne peut contrôler la quantité endogène d'acide rétinoïque. En testant l'effet de l'incorporation au milieu de culture d'un anticorps monoclonal anti-acide rétinoïque qui neutraliserait l'action de ce dernier, sur la différenciation des cellules, la Demanderesse a constaté que la présence de cet anticorps accroît la présence dans les cultures de cellules et colonies à activité phosphatase alcaline.

La cytokine peut notamment être choisie parmi le LIF, IL-11, IL-6, CNTF et oncostatine M (OSM) ; de manière avantageuse les cytokines présentes dans le milieu de culture décrit précédemment, comprennent au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6, et 5 leurs différents mélanges, qui donnent les meilleurs résultats de stimulation de croissance.

De préférence, le facteur de croissance des fibroblastes est le b- FGF (ou basic Fibroblast Growth Factor) et le facteur de croissance analogue de l'insuline est l'IFG-1.

10 Le facteur de croissance des cellules souches (ou SCF) est de préférence l'a-SCF (ou avian Stem Cell Factor) et le m-SCF (ou murine Stem Cell Factor).

15 L'un des aspects préférés de l'invention concerne un milieu de culture qui contient, outre les éléments nutritifs de base nécessaires à la croissance de cellules, une combinaison de b-FGF, SCF et LIF. En outre, la présence dans le milieu d'un anticorps monoclonal neutralisant l'activité de différenciation exercée par l'acide rétinoïque augmente le nombre de cellules souches embryogènes totipotentes.

20 La présence d'un tapis de cellules nourricières favorise la croissance de cellules ES aviaires. Divers types de cellules connues de l'homme du métier peuvent être utilisées ; on peut citer en particulier des cellules telles que les cellules STO, traitées à la mitomycine ou irradiées, les cellules BRL-3A, les cellules LMII, les cellules QT6 et cellules QT6 modifiées 25 telles que les cellules QT6 Isolde, les cellules différenciées établies en lignée à partir des cultures de cellules souches embryonnaires induites à différencier.

Les cellules STO sont des fibroblastes d'embryons de souris (catalogue ATCC) ; les cellules BRL-3A (catalogue ATCC) sont des cellules de foie de "Buffalo rat liver". Les cellules QT6 (catalogue ATCC) et cellules QT6 30 modifiées telles que les cellules QT6 Isolde sont des fibroblastes de caille (Cosset et col., 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) et les cellules LMII proviennent de carcinome de foie de poulet (Kawagucchi et col., 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

35 Le milieu de culture contient en outre différents éléments nutritifs essentiels et des antibiotiques.

Un milieu de culture particulièrement adapté à la présente invention possède la composition suivante :

BHK-21

	Sérum foetal de bovin	10%
5	Sérum de poulet	2%
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acides aminés non essentiels	1%
	Pyruvate de sodium	1 mM
	Nucléosides stock	1%
10	Hepes (1M)	10 mM
	β -mercaptoéthanol	0,2 mM
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 μ g/ml
	Gentamycine	10 ng/ml

15

Additifs:

Final

20	bFGF	de 1 à 20 ng/ml
	a-SCF	de 0,5% à 2% vol/vol
	IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
	LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée soit environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées
25	IL-6	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)
	IL-11	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)

30

De manière avantageuse la concentration en bFGF est supérieure à 5 mg/ml et la concentration en IGF-1 est supérieure à 10 ng/ml.

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine 80 mg

guanosine 85 mg

5 cytidine 73 mg

uridine 73 mg

thymidine 24 mg

H₂O 100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7
10 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du
cDNA du facteur considéré,
et convient à la culture de cellules embryonnaires totipotentes d'oiseau.

Le milieu BHK21 (ou milieu MEM) est un milieu de culture qui a été
décrit notamment par Mc Pherson, I., et Stoker (1962, Virology 16, 147).

15 Hepes est de l'hydroxy-éthyl-pipérazine-éthane-sulfonate.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de
culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES
aviaires), caractérisé en ce que :

a) on met en suspension des cellules provenant de disques
20 blastodermiques d'oeufs fécondés dans un milieu de culture pour
cellules aviaires comprenant en outre au moins un composé choisi
parmi les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les
facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance
des cellules souches, et dans lequel l'acide rétinoïque est
25实质iellement inactivé,

b) on ensemente un tapis de cellules nourricières ou une boite de culture
gélatinée avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),

c) on met les cellules à incuber pendant une durée déterminée,

d) les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des
30 cellules ES d'oiseau.

De préférence, entre les étapes c) et d) on effectue une ou plusieurs
additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui
utilisé dans l'étape a).

Dans un de ses modes de mise en oeuvre, au cours de l'étape c), on effectue un réensemencement du milieu par une suspension de cellules identique à la suspension préparée à l'étape a).

Le milieu de l'étape a) contient de préférence les éléments suivants:
5 b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et anticorps anti-acide rétinoïque. Selon l'un des aspects de l'invention, il contient en outre les composés suivants :

- . Sérum foetal de bovin
- 10 . Sérum de poulet .
- . Conalbumine
- . Acides aminés non essentiels
- . Pyruvate de sodium
- . Stock de nucléosides
- 15 . Hepes (1M)
- . β -mercaptopropanoïd
- . Penicilline
- . Streptomycine
- . Gentamycine

20

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

De manière facultative, au cours du procédé selon l'invention, on effectue entre les étapes c) et d) l'addition de milieu neuf au 3ème jour
25 puis le milieu est changé tous les jours jusqu'au prochain repiquage.

L'étape d) peut notamment être effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

On peut recueillir directement les cultures primaires de cellules, qui
30 seront ensuite congelées, ou bien réaliser des cultures secondaires successives à partir des cellules de la culture primaire. Dans ce cas, à l'issue de l'étape d), on effectue une étape e) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières ou sur boîtes gélatinées, de manière à obtenir une culture secondaire.

Les étapes d) et e) peuvent être répétées plusieurs fois pour avoir des cultures tertiaires et successives.

Le tapis de cellules nourricières peut être constitué de différents types de cellules décrits précédemment, notamment de cellules STO mitomycinées ou irradiées.

Un autre des objets de l'invention est une culture de cellules ES d'oiseau, ou des cellules ES aviaires, susceptibles d'être obtenues par le procédé défini ci-dessus. Une cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES-aviaire en culture.

Enfin, un procédé de production d'une protéine recombinante, caractérisé en ce qu'on intègre le gène codant pour ladite protéine dans le génome d'une cellule embryonnaire totipotente aviaire en culture est également compris dans l'invention.

La Demanderesse a mis au point un milieu de culture et des conditions de culture in vitro permettant de maintenir en culture des cellules d'oiseau qui présentent des propriétés morphologiques, cinétiques et histochimiques rappelant celles des cellules embryonnaires totipotentes. Ces observations ont été effectuées aussi bien avec des cellules dérivant de disques blastodermiques de caille que de poulet. La croissance de ces cellules en culture in vitro est rendue possible par la mise au point d'un milieu original spécialement adapté à la culture de cellules embryonnaires d'oiseau. On sait que la présence, le maintien et la propagation de cellules totipotentes en culture permettent leur injection dans des embryons receveurs. La contribution à la morphogenèse des tissus somatiques et germinaux chez les animaux receveurs grâce à un caractère totipotent, peut conduire à l'obtention d'animaux transgéniques.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1: Effet des combinaisons de facteurs

- blastoderme de caille, 0,75 bl/ml
- fond de gélatine
- culture de 3 j

Figure 2: effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

- blastodermes de caille, 0,75 bl/ml
- fond avec ou sans gélatine
- culture de 4 j

5

Figure 3: comparaison de différentes cytokines

- blastodermes de caille, 2 bl/ml
- fond avec gélatine
- culture de 2 + 3 j

10

Figure 4: Comparaison d'un ensemencement sur gélatine et sur tapis de cellules traitées à la mitomycine C en présence de différentes cytokines appartenant toutes à la même famille.

15

- 4A:** - blastodermes de caille, 1 + 1,5 bl/ml
 - fond avec gélatine
 - culture de 3 + 4 j

- 4B:** - blastodermes de caille, 1 + 1,5 bl/ml
 - fond avec cellules STO
 - culture de 3 + 4 j

20

Figure 5: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par ECMA-7

- blastodermes de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

25

Figure 6: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par NC-1

- blastodermes de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

30

Figure 7 : Animaux chimères obtenus par injection in ovo dans des embryons de cellules maintenues en culture. Cellules injectées après 8 ou 10 jours de culture.

35

Matériel et méthodes**Préparation des cellules**

Les oeufs de poules fraîchement pondus, non incubés, 5 correspondent au stade X de développement (Eyal Giladi and Kovak, 1976) ; les oeufs de caille "C. coturnix japonica" sont également utilisés dès la ponte et non incubés.

Le disque blastodermique (3-4 mm de diamètre pour la poule, 2-2,5 mm pour la caille) est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur dans du milieu 10 complet sans facteurs. Les cellules sont centrifugées à 200 g, lavées deux fois dans du milieu afin d'éliminer le maximum de vitellus contaminant, resuspendues à raison de 2 disques pour 1 ml de milieu et dissociées mécaniquement par passage dans une aiguille de 23 G. Les facteurs sont alors ajoutés.

15 La suspension cellulaire est déposée:

- soit sur boites ou puits (Costar) préalablement gélatinés (0,2 % gélatine, 1 h à t° ambiante),

- soit sur un tapis de cellules STO préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ 20 cellules / cm²,

- soit sur un tapis de cellules Isolde préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm².

25 Milieu de culture STO :

final

DMEM

Sérum foetal Bovin	10 %
30 Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
L-Glutamine	2 mM

Milieu de culture Isolde :

		final
	DMEM	
5	Sérum foetal Bovin	8 %
	Sérum de poulet	2 %
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
	G418	100 µg/ml
10	Hygromycine	50 µg/ml
	Phléomycine	50 µg/ml
	TBP (bouillon tryptose phosphate)	10%

Les drogues de sélection sont ajoutées en entretien mais enlevées
 15 deux jours avant le traitement à la mitomycine C.

Dans tous les cas, un second ensemencement est réalisé dans les mêmes conditions après deux jours de culture.

Cultures

20 Les cultures sont incubées à 37 °C ou à 41° C, dans une atmosphère contrôlée en CO₂ (7,5 %) et leur évolution est suivie au microscope en contraste de phase. Une addition partielle (50 %) de milieu neuf avec les facteurs est réalisée le 3 ème jour de culture, puis le milieu est changé tous les jours. A chaque moment, les cellules en croissance peuvent être soit 25 fixées pour étude, soit prélevées pour être ré-ensemencées en culture secondaire ou supérieure, sur tapis de cellules STO mitomycinées irradiées ou sur boîtes gélatinées.

En cas de fixation, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis fixées *in situ* 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % à froid (0-4 °C). Après plusieurs lavages au PBS, différentes colorations peuvent être réalisées selon l'un des protocoles suivants :

12

* détection de l'activité phosphatase alcaline endogène,

	tampon de réaction:	NaCl	100 mM
		Tris HCl pH 9.5	100 mM
5		MgCl ₂	5 mM
		NBT	1 mg/ml
		BCIP	0,1 mM/ml
		H ₂ O	

(temps de lecture, de 5 à 30 min, 37°C)

10

** détection de l'activité de β-galactosidase exogène

	tampon de réaction:	Ferricyanure de K	5 mM
		Ferrocyanure de K	5 mM
		MgCl ₂	5 mM
15		X-gal	1 mg/ml
		PBS	

(temps de lecture, de 1 à 2 heures, 37°C)

*** détection par immunocytochimie de la présence d'épitopes spécifiques
20 (réaction à 4°C)

	blocage en tampon PBS - BSA (1 mg/ml)
	lavage en PBS - BSA
	anticorps primaire 1/ 10 ^{ème} ou 1/ 50 ^{ème}
	anticorps secondaire fluorescent 1/ 50 ^{ème}
25	la détection est réalisée sous microscope inversé à fluorescence.

Repiquage

En cas de passage en culture secondaire ou successive, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis incubées 10-30 min dans
30 une solution enzymatique. On peut utiliser une solution de collagénase-dispase (1 mg/ml soit 1 U/ml final) à laquelle une solution de hyaluronidase (1 mg/ml final soit 1 U/ml) peut être ajoutée ; on peut également utiliser une solution de pronase à 0,25 mg/ml final. Les cellules ou les petits amas de cellules ainsi isolés enzymatiquement sont lavées en

milieu ESA, resuspendus, déposés sur un coussin de milieu de séparation de lymphocyte de densité ($d= 1,077-1,080$) et centrifugés 20 min à t° ambiante à 800 g afin de débarasser les cellules non différenciées de blastoderme des cellules du tapis, des débris divers et des restes de vitellus contaminants.

- 5 L'interface est alors prélevée, lavée deux fois en milieu ESA. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu et dissocié légèrement mécaniquement avant d'être ensemencé sur un nouveau tapis de cellules nourricières, comme précédemment décrit. L'équivalent de 6 disques blastodermiques initiaux est ré-ensemencé dans 2 ml. Cette étape de gradient n'est parfois
10 pas nécessaire lors des passages successifs, en fonction de la très grande homogénéité des cultures obtenues.

Les cellules dissociées peuvent être déposées sur un gradient multicouche de Percoll et centrifugées dans les mêmes conditions. Les interfaces sont alors prélevées, lavées dans un milieu ESA et les cellules les
15 plus immatures des interfaces supérieures réensemencées, ou injectées dans des embryons receveurs.

Congélation

A l'issue de la culture primaire ou successive, les cellules
20 récupérées de gradient peuvent être congelées dans un mélange constitué de 40 % FBS, 50 % milieu ESA et 10 % DMSO. Les cellules équivalant à 24 blastodisques initiaux sont reprises dans 0,5 ml de milieu ESA, resuspendues et 0,4 ml de serum est ajouté. 0,1 ml de DMSO est alors ajouté très lentement. La suspension de congélation est répartie dans des tubes à
25 congélation (0,5 ml/tube) et congelée lentement à -80 °c avant d'être transférée dans l'azote liquide.

Résultats

Un milieu de base appelé milieu "ESA" pour "Embryonic Stem cells Avian" dérivant d'un milieu utilisé pour les cellules ES murines a été préparé. Il présente la composition suivante :

Milieu "ESA":

final

5	BHK-21	
	Foetal Bovine Serum	10 %
	Serum de poulet	2 %
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acide Aminés non essentiels	1 %
10	Pyruvate de sodium	1 mM
	Stock de nucléosides	1 %
	Hepes (1M)	10 mM
	β-mercaptopropanoïde	0.2 mM
	Penicilline	100 U/ml
15	Streptomycine	100 µg/ml
	Gentamycine	10 ng/ml

A ce milieu de base "ESA", des facteurs de croissance ont été ajoutés afin de comparer leur contribution respective à la formation de colonies présentant un caractère morphologique et biochimique intéressant. Leurs concentrations sont indiquées ci-après :

Additifs:

		stock	final
25	bFGF	10 µg/ml	10 ng/ml
	a-SCF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IGF-1	10 µg/ml	20 ng/ml
	LIF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IL-11	10 µg/ml	10 ng/ml
30	IL-6	10 µg/ml	10 ng/ml
	ARMA	10 mg/ml	1 µg/ml
	OSM	20 µg/ml	20 ng/ml
	CNTF	20 µg/ml	20 ng/ml

stock de nucléosides

	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
5	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

* surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du cDNA du facteur considéré.

10

Le premier critère utilisé pour évaluer l'effet de ces facteurs et des modifications apportées au milieu a été la détection par coloration biochimique de l'activité phosphatase alcaline endogène qui semble spécifique d'un certain nombre de cellules telles que les cellules ES totipotentes, les cellules précurseurs dérivés de la lignée germinale et certaines cellules différenciées, facilement identifiables à leur morphologie épithélioïde.

Les cellules des disques blastodermiques sont ensemencées en milieu ESA en présence de différentes combinaisons de facteurs. Après 3 j de culture, les cellules sont fixées, colorées et les colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP+) sont dénombrées.

L'effet des différentes combinaisons de facteurs est représenté sur la figure 1.

25 Conclusion

Parmi les facteurs testés, la combinaison du SCF (Stem Cell Factor d'origine murine -mSCF- ou aviaire -aSCF-), du b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) et du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) donne le meilleur nombre de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline dans les cultures avec un accroissement de 2-3 fois par rapport à la présence de chaque facteur ajouté individuellement ou deux par deux et par rapport au fond, constitué en majorité de cellules faiblement positives et présentant une morphologie épithélioïde différenciée.

II) Effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

Les cellules sont ensemencées soit sur boites non traitées, soit
5 traitées à la gélatine dans du milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et LIF (Leukemia Inhibitory Factor). L'anticorps ARMA est ajouté à raison de 1 µg/ml final. Les cellules et colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP +) sont
10 dénombrées après 4 j de culture.

Les résultats sont représentés sur la figure 2.

Comparativement aux différents moyens décrits comme l'utilisation de résine ou de charbon, et testés pour essayer de contrôler le niveau d'acide rétinoïque dans le milieu, l'addition de l'anticorps anti acide rétinoïque dans le milieu donne les meilleurs résultats quant à la qualité et
15 la quantité des colonies présentes dans les cultures

Conclusion

L'addition de l'anticorps anti-acide rétinoïque dans le milieu de culture accroît de façon notable la présence et /ou le maintien des colonies à activité phosphatase alcaline.
20

III) Effet des cytokines

Nous avons voulu vérifier si le LIF ou d'autres cytokines de la même famille pouvait induire la prolifération des cellules ES chez l'oiseau.
25

Les cellules sont ensemencées en milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) en présence d'ARMA (1 µg/ml) et après addition ou non de différentes cytokines de la même famille LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6). Afin d'accroître l'adhésion et la formation de colonies phosphatase alcaline positives ainsi que leur taille, un second ensemencement a lieu 2 jours après le premier. La fixation, coloration et
30 35 lecture des colonies a eu lieu 3 jours après le second ensemencement.

La comparaison de l'effet des différentes cytokines est représentée sur la figure 2.

Conclusion

5 Le rôle des cytokines LIF, IL-11 et IL-6 semble particulièrement prononcé et pratiquement équivalent dans l'obtention de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline.

IV) Role d'un tapis de cellules nourricières

10 Chez la souris, la croissance de certaines cellules ES requiert la présence d'un tapis de cellules nourricières. L'effet de ces cellules sur les cellules d'embryons d'oiseau a été testé

15 Les cellules sont ensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) comparativement soit sur un fond de gélatine soit sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après trois jours de culture, un 20 nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines CNTF (Ciliary Neuro-Trophic Factor), OSM (Oncostatin M), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment.

25 La figure 4A représente la croissance de cellules sur gélatine en présence de différentes cytokines. La figure 4B représente la croissance de cellules sur un tapis de cellules nourricières en présence des mêmes cytokines.

Conclusion

30 Le nombre de colonies dérivant des cellules de blastoderme et présentant une activité phosphatase alcaline est très nettement accru en présence d'un tapis de cellules nourricières (environ 4-5 fois) avec un

maintien entre les deux systèmes des même sensibilités vis à vis des cytokines ajoutées dans le milieu. Les cytokines LIF, IL-11 et IL-6 présentent les meilleurs résultats de stimulation de croissance. Dans des résultats préliminaires, il apparaît de plus que la combinaison de ces 3 cytokines dans le milieu complet ESA avec facteurs produisent des effets cumulatifs très prometteurs quant au maintien et à la prolifération des colonies tant avec des cellules dérivées de disques blastodermiques de caille que de poulet.

10 V) Caractéristiques immunocytochimiques

Des études de réactivité par rapport à différents anticorps ont été réalisées. Les anticorps ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3, spécifiques d'un état de totipotence des cellules ES murines sont capables de reconnaître des épitopes dans les populations de cellules aviaires, maintenues dans les cultures. Pour illustrer ces reconnaissances par les anticorps, des doubles marquages activité phosphatase alcaline et anticorps démontrent que toutes les cellules ou les massifs de cellules reconnues par ECMA-7 présentent une activité phosphatase alcaline. Cette propriété a été observée avec tous les anticorps utilisés à des degrés divers.

Les colonies de cellules phosphatase alcaline positives sont pour environ 20 % d'entre elles marquées par l'anticorps ECMA-7. Cette reconnaissance suggère la présence dans ces massifs et dans ces seules conditions de culture de cellules à caractère "ES". Néanmoins, une hétérogénéité dans les massifs phosphatase alcaline positifs suppose des degrés variables dans l'intensité du caractère "ES".

Cette hétérogénéité de distribution a été observée sur des cultures primaires. Après repiquages, la proportion de cellules positives, notamment pour ECMA-7, mais également pour SSEA-1 et EMA-1, tend à s'accroître de façon très importante pour obtenir des cultures très homogènes.

La figure 5 montre respectivement l'activité phosphatase alcaline et la reconnaissance par l'anticorps ECMA-7 de colonies de cellules issues de la culture de blastoderme de caille en présence de différentes cytokines.

Les anticorps SSEA-1, SSEA-3, également utilisés sur des cellules ES murines reconnaissent également des cellules aviaires dans les massifs phosphatase alcaline positifs.

Les anticorps NC-1, HNK-1 dirigés respectivement des épitopes de 5 cellules de crêtes neurales et de cellules "human natural killer" reconnaissent en fait les mêmes épitopes et ont été montrés comme reconnaissant certaines cellules immatures du disque blastodermique de poulet. Dans notre système, ces deux anticorps reconnaissent là encore des cellules dans des massifs à activité phosphatase alcaline.

10 Les résultats avec NC-1 sont représentés sur la figure 6.

Les cellules sont ensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et 15 anticorps ARMA (1 µg/ml) sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après deux jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment. La double coloration, activité 20 phosphatase alcaline et détection des épitopes par anticorps est réalisée suivant les protocoles présentés précédemment.

Par ailleurs, l'anticorps EMA-1 (Hahnel and Eddy, 1986) initialement dirigé contre des épitopes présents sur les cellules primordiales de la lignée germinale murine a été utilisé contre ces mêmes cellules chez le 25 poulet. En testant cet anticorps dans notre système de culture, nous pouvons démontrer que EMA-1 reconnaît des cellules et colonies de cellules présentant toutes une activité phosphatase alcaline. Il a été par ailleurs vérifié que cet anticorps EMA-1 ne reconnaissait les cellules ES murines que dans leur état de totipotence non différencié.

30 Les anticorps ont été testés soit sur des cultures non différenciées obtenues telles que décrites dans Matériel et Méthodes soit sur des cultures qui ont été traitées avec un excès d'acide rétinoïque ajouté à la culture (10⁻⁶ M) pendant au moins 48 heures. Le tableau ci-après indique l'état de reconnaissance par les différents anticorps utilisés.

		Non différenciées	Différenciées
5	Anticorps monoclonal		
	ECMA-7	+++++	-
	SSEA-1	+++++	-
	SSEA-3	+++	-
10	TEC-01	+++++	-
	TEC-02	+	++
	TEC-03	++	++
	EMA-1	++++	+
	EMA-6	+++	+
15	TROMA-1	-	++++
	NC-1	++++	+
	HNK-1	++++	+

- NC-1 et HNK-1 reconnaissent les mêmes épitopes
- 20 SSEA-1 et TEC 01 reconnaissent les mêmes épitopes
- Il apparaît que l'expression de ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) est la plus importante, suggérant une véritable nature de cellules ES, que TEC-01 (Drabek et al. (1987)) et SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) reconnaissent les mêmes épitopes sur des cellules non différenciées exclusivement. A 25 l'inverse, l'augmentation d'expression de TEC-02 (Drabek et al. (1987)) peut dans ce sens indiquer un état de différenciation induit ou spontané. L'achèvement de cette perte de nature ES est caractérisée par la forte expression de TROMA-1 (Bruylants et al. (1980)), présent sur les seules cellules différenciées. L'ensemble de ces anticorps permet donc d'avoir une idée 30 sur l'état de différenciation d'une culture. Des anticorps comme TEC-03 (Drabek et al. (1987)) apparaissent comme relativement indifférents à l'état prononcé de différenciation.

Il est par ailleurs à souligner que jusqu'à présent ni ECMA-7, ni SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03, TROMA-1 n'ont fait l'objet de publication démontrant la réactivité sur des coupes, des cellules ou tout matériel d'origine aviaire.

5

Conclusion

Parmi les anticorps testés, certains comme ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)) sont caractéristiques des cellules "ES" murines. Ces anticorps reconnaissent des cellules donc potentiellement totipotentes dans les cultures aviaires. Les mêmes observations ayant été obtenues soit avec des cultures de caille soit de poule. D'autres anticorps comme EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 et HNK-1 (Obo and Balch (1981)) sont connus pour reconnaître des épitopes aviaires (et murin pour EMA-1) de cellules très indifférenciées et donc aussi susceptibles de reconnaître un profil de cellules souches aviaires.

VI) Repiquage des cellules

Les cellules de disques blastodermiques de caille ou de poulet sont ensemencées sur tapis de cellules nourricières STO. Après différents jours de culture, les cellules sont repiquées sur tapis de cellules STO comme décrit en Matériel et méthodes. La détection de cellules et massifs positifs à la fois pour l'activité de phosphatase alcaline et pour la colocalisation d'un marquage par ECMA-7 ou NC-1 suggère que les conditions de cultures sont définies pour maintenir dans les cultures secondaires et tertiaires des cellules à caractère totipotent. Le processus de repiquage assure d'ailleurs dès après le premier passage une homogénéité à l'ensemble de la culture, tant morphologiquement, que par la détection des différents épitopes. Les massifs de cellules deviennent très étendus et homogènes, caractère accru par la grande capacité de ces cellules à se diviser rapidement, contrairement aux cellules différencierées présentes initialement dans la culture primaire. Jusqu'à présent, ces critères d'identification et de caractérisation peuvent être utilisés et détectés pendant au moins 5 semaines après l'ensemencement.

VII) Injection des cellules dans des embryons receveurs

Les cellules blastodermiques de poulet obtenues en cultures primaires ou après repiquages successifs peuvent être injectées dans des embryons receveurs. Afin de visualiser rapidement une contribution phénotypique des cellules du donneur dans un embryon de poussin receveur, les cellules maintenues en culture proviennent d'une souche pigmentée et les embryons receveurs d'une souche non pigmentée. Les cellules maintenues en cultures sont dissociées et préparées comme décrit 5 dans Matériel et Méthodes selon le même procédé que pour un repiquage. La suspension cellulaire est alors préparée à raison de 1 à 3 x 10⁵ cellules par ml de milieu ESA. L'oeuf fraîchement pondu, non incubé contenant l'embryon receveur est légèrement irradié entre 5 Gy et 7 Gy. Une petite fenêtre de quelques mm² est réalisée dans la coquille du receveur par 10 meulage. La membrane coquillière est découpée au scalpel et les cellules sont injectées à l'aide d'un capillaire étiré dans la cavité subgerminale du disque blastodermique dans un volume de 1 à 5 µl, ce qui correspond de 100 à 1500 cellules au maximum. La moyenne des cellules injectées est de 500 15 cellules. La fenêtre est alors recouverte de membranes coquillières et scellée. Un morceau de pansement adhésif est appliqué pour parfaire l'étanchéité et limiter au maximum l'évaporation. Après 4 jours d'incubation dans les conditions optimales, les œufs sont ouverts et les 20 embryons bien développés sont transférés dans une coquille plus grande et remis en incubation pour finir leur développement de façon satisfaisante.

Un certain nombre d'animaux ont ainsi été obtenus et montrent un taux apparent de chimérisme, phénotypiquement détectable par le marqueur de plumage utilisé et caractéristique de la souche des cellules dérivant de la souche donneur, variant de 5% à 90%. Ce chimérisme peut 25 être obtenu jusqu'à présent indifféremment avec des cellules dérivant de cultures primaires, secondaires, tertiaires. Il est à noter que les pourcentages d'animaux chimères et les taux de chimérisme de ces 30 animaux ne varient pas de façon importante en fonction du temps de culture des cellules injectées. Ceci contribue à souligner la capacité du milieu et du procédé décrit à maintenir des cellules avec un caractère 35 totipotent.

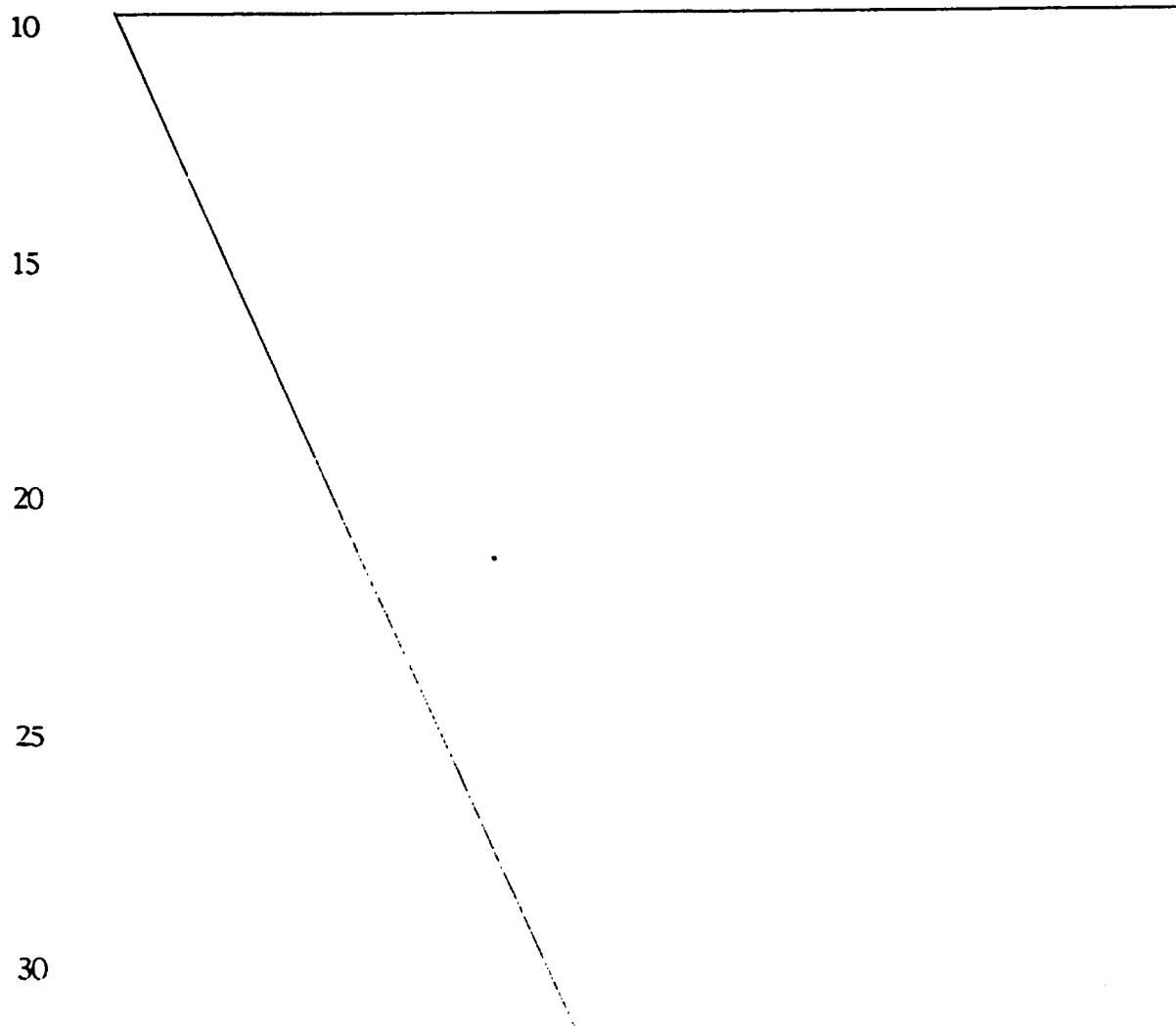
Exemple : animal contrôle non injecté (Fig. 7A)

Animal n° 1786-1787 à faible taux de chimérisme (5-10%)

Animal n° 1782-1783 à taux moyen de chimérisme (50%)

5 Animal n° 1740-1741 à fort taux de chimérisme (90%)

Ces animaux sont présentés sur les figures 7B à 7D.



REFERENCES

- Brulet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113.
- 5 Draber et al. (1987). Cell Differentiation 21, 119.
- Draber et al. (1987). Cell differentiation 21, 227.
- Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15, 25.
- 10 Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.
- Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024.
- 15 Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565.
- Shevinsky et al. (1982). Cell 30, 697.
- Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.
- 20 Urven et al. (1988). Development 103, 299.
- 25
- 30

REVENDICATIONS

1. Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour celles aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant : les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogues de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches,
5 et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinoïque actif.
2. Milieu de culture selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA).
3. Milieu de culture selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la cytokine est choisie parmi le LIF, IL-11, IL-6, CNTF, oncostatine M (OSM), et leurs mélanges.
15
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6, et leurs différents mélanges.
5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance des fibroblastes qui est le b-FGF.
20
6. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance analogue de l'insuline qui est l'IGF-1.
25
7. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance des cellules souches choisi parmi l'a-SCF et le m-SCF.
8. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte un tapis de cellules nourricières.
30

9. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il a la composition suivante :

BHK-21

5	Sérum foetal de bovin	10%
	Sérum de poulet	2%
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acides aminés non essentiels	1%
	Pyruvate de sodium	1 mM
10	Stock de nucléosides	1%
	Hepes (1M)	10 mM
	β-mercaptoéthanol	0,2 mM
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
15	Gentamycine	10 ng/ml

Additifs:

Final

20	bFGF	de 1 à 20 ng/ml
	a-SCF	de 0,5% à 2% vol/vol
	IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
	LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée
	IL-6	de 5 à 50 ng/ml
25	IL-11	de 5 à 50 ng/ml

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine 80 mg

guanosine 85 mg

cytidine 73 mg

5 uridine 73 mg

thymidine 24 mg

H₂O 100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du
10 cDNA du facteur considéré.

10. Procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), caractérisé en ce que :

a) on met en suspension des cellules provenant de disques blastodermiques d'oeufs non fécondés dans un milieu de culture pour
15 cellules aviaires comprenant en outre au moins un composé choisi parmi les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et dans lequel l'acide rétinoïque est substantiellement inactivé,

20 b) on ensemence un tapis de cellules nourricières avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),

c) on met les cellules à incuber pendant une durée déterminée,

d) les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES d'oiseau.

25 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'entre les étapes c) et d), on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape a).

12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que le milieu de l'étape a) contient les éléments suivants : b-FGF, a-SCF,
30 IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et des anticorps anti-acide rétinoïque.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le milieu de l'étape a) contient en outre les composés suivants :

- . Sérum foetal bovin
- 5 . Sérum de poulet
- . Conalbumine
- . Acide aminés non essentiels
- . Pyruvate de sodium
- . Stock de nucléosides
- 10 . Hepes (1M)
- . β -mercaptopropanoïd
- . Penicilline
- . Streptomycine
- . Gentamycine

15

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :
adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'entre les étapes c) et d), on effectue l'addition de milieu neuf au 3ème jour, puis tous les jours.

15. Procédé selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisé en ce que l'étape d) est effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

25 16. Procédé selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisé en ce qu'à l'issue de l'étape d), on effectue une étape e) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières, de manière à obtenir une culture secondaire.

30 17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les étapes d) et e) sont répétées plusieurs fois.

18. Procédé selon l'une des revendications 10 à 17, caractérisé en ce que le tapis de cellules nourricières est constitué de cellules STO mitomycinées ou irradiées.

5 19. Culture *in vitro* de cellules ES aviaires susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 10 à 18.

20. Cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée, caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES aviaire en culture.

10 21. Animal transgénique obtenu, au moins en partie, à partir de cellule embryonnaire selon la revendication 20.

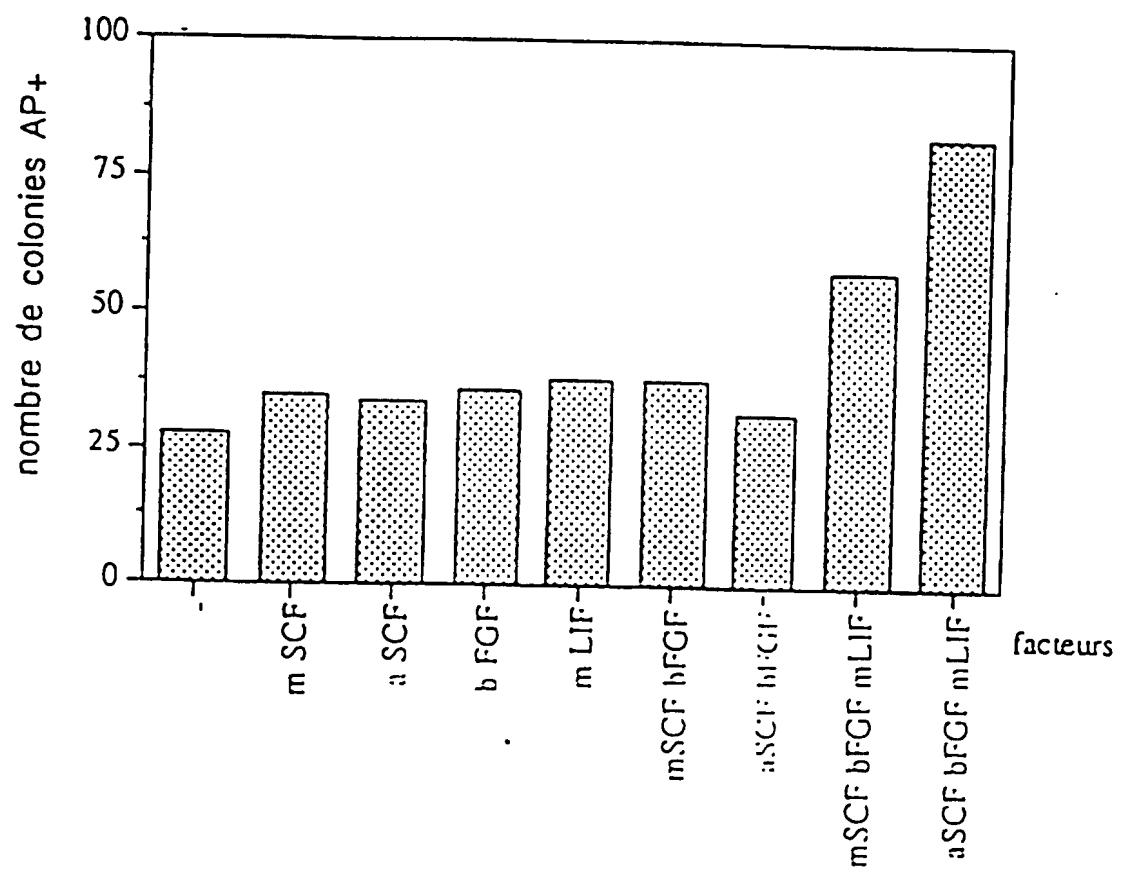


Figure 1

2/7

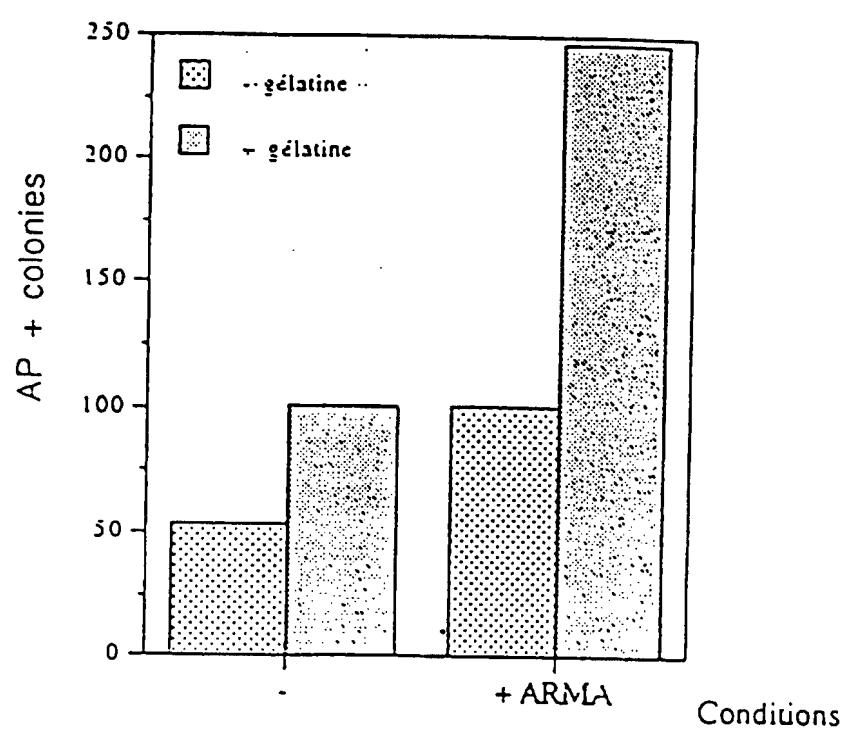


Figure 2

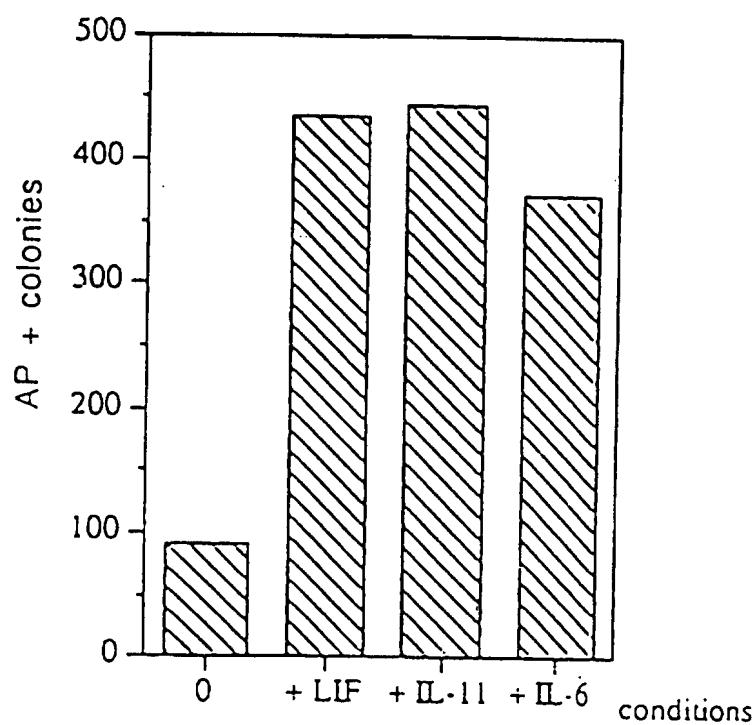
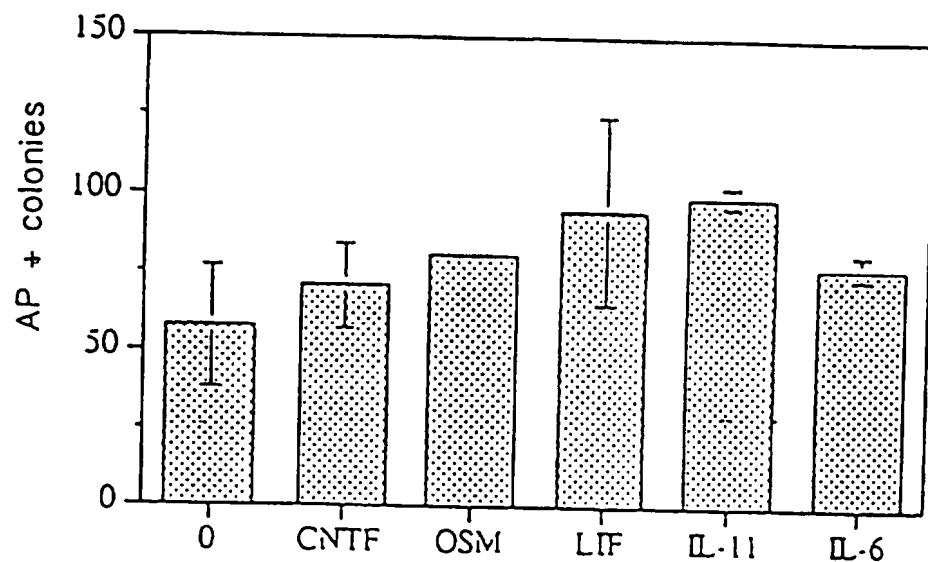
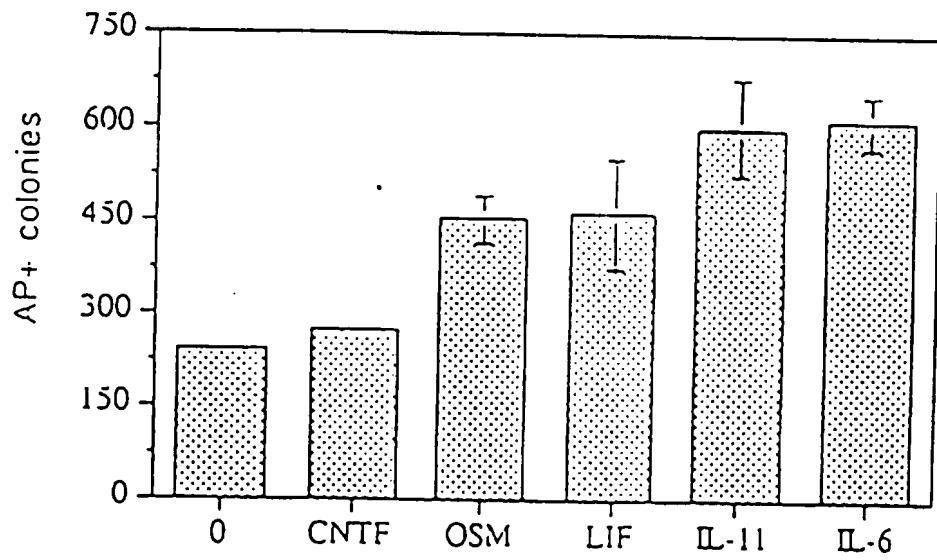


Figure 3

4/7



A



B

Figure 4

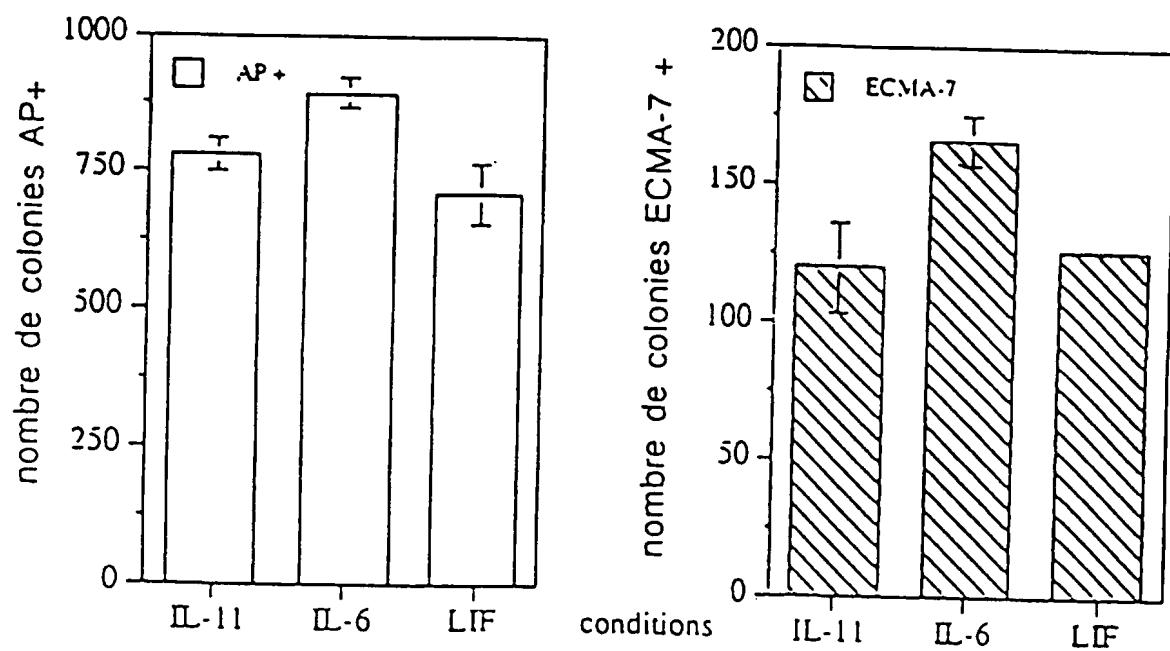


Figure 5

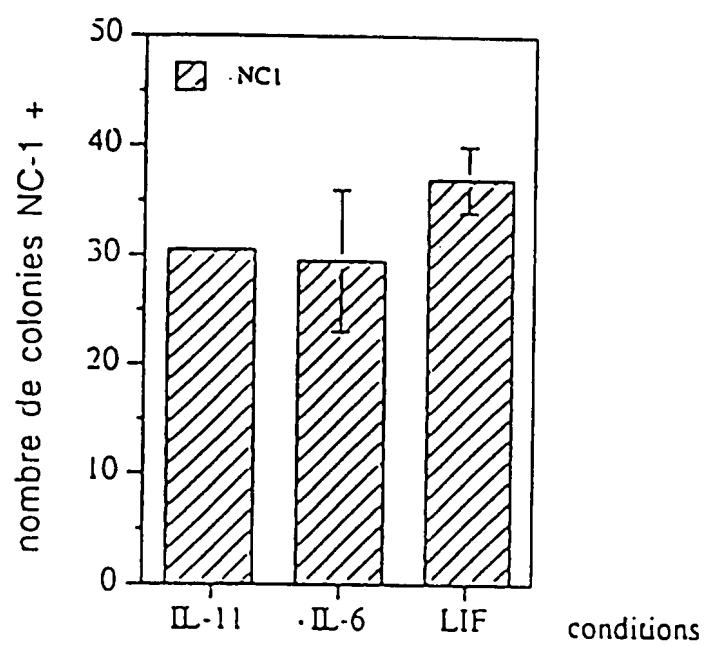
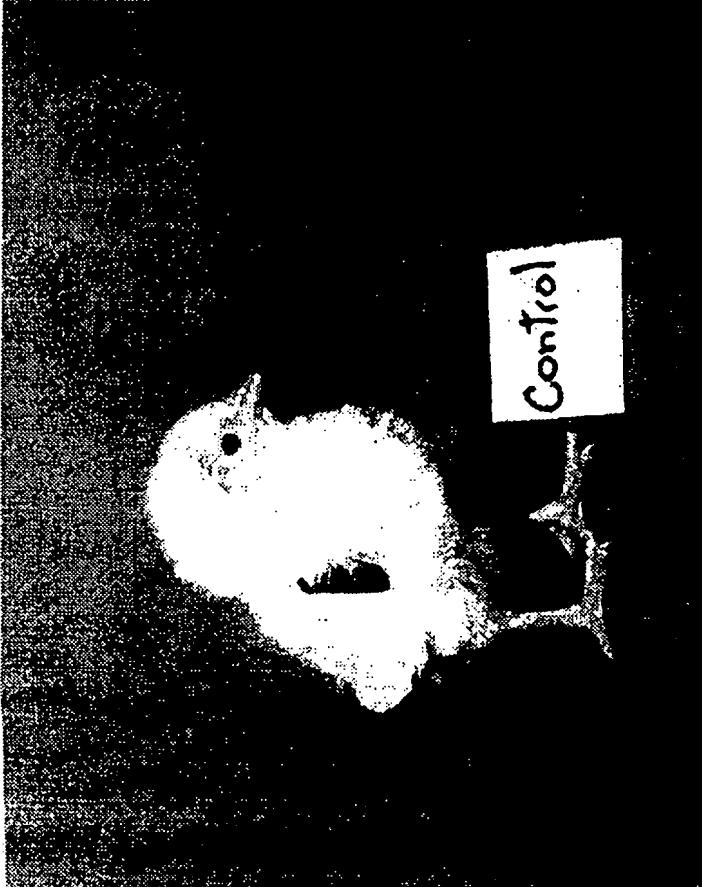


Figure 6

7/7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N5/06 C12N5/10 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 15185 (UNIV NORTH CAROLINA ;EMBREX INC (US)) 5 August 1993 see page 3, line 35 - page 4, line 37 ---	19-21
X	WO,A,93 23528 (UNIV NORTH CAROLINA ;PETITTE JAMES N (US); YANG ZENGMING (US)) 25 November 1993 see page 1, line 6 - page 4, line 18 see page 4, line 32 - page 6, line 27 ---	19-21
X	WO,A,90 01541 (AMRAD CORP LTD) 22 February 1990 see page 1, line 16 - page 5, line 27 ---	19-21
A		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 1996

Date of mailing of the international search report

05.03.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2233 RD Delft

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/FR 95/01389

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 87191399, SMITH ET AL 'BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS' & DEV BIOL, (1987 MAY) 121 (1) 1-9 see abstract</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 93365092, SLAGER ET AL 'TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA IN THE EARLY MOUSE EMBRYO:IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF MUSCLE FORMATION AND IMPLANTATION' & DEV GENET, (1993) 14 (3) 212-24 see abstract</p> <p>---</p>	
A	<p>R.IAN FRESHNEY 'SECOND EDITION.CULTURE OF ANIMAL CELLS.A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE' 1987 , ALAN R.LISS, INC. , NEW YORK see page 187 - page 196</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9315185	05-08-93	AU-B-	3596993	01-09-93
		AU-B-	3597093	01-09-93
		EP-A-	0625007	23-11-94
		JP-T-	7504320	18-05-95
		WO-A-	9314629	05-08-93
		ZA-A-	9300585	01-09-93
		ZA-A-	9300586	01-09-93
<hr/>				
WO-A-9323528	25-11-93	US-A-	5340740	23-08-94
		AU-B-	4375193	13-12-93
<hr/>				
WO-A-9001541	22-02-90	AU-B-	623922	28-05-92
		AU-B-	4059089	05-03-90
		EP-A-	0380646	08-08-90
		JP-T-	3503241	25-07-91
		US-A-	5166065	24-11-92
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PC1/FR 95/01389

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N5/06 C12N5/10 A01K67/027

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 15185 (UNIV NORTH CAROLINA ;EMBREX INC (US)) 5 Août 1993 voir page 3, ligne 35 - page 4, ligne 37 ---	19-21
X	WO,A,93 23528 (UNIV NORTH CAROLINA ;PETITTE JAMES N (US); YANG ZENGMING (US)) 25 Novembre 1993 voir page 1, ligne 6 - page 4, ligne 18 voir page 4, ligne 32 - page 6, ligne 27 ---	19-21
X	WO,A,90 01541 (AMRAD CORP LTD) 22 Février 1990 voir page 1, ligne 16 - page 5, ligne 27 ---	19-21
A	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou citer pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PC1/FR 95/01389

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 87191399, SMITH ET AL 'BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS' & DEV BIOL, (1987 MAY) 121 (1) 1-9 voir abrégé</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 93365092, SLAGER ET AL 'TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA IN THE EARLY MOUSE EMBRYO: IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF MUSCLE FORMATION AND IMPLANTATION' & DEV GENET, (1993) 14 (3) 212-24 voir abrégé</p> <p>---</p>	
A	<p>R.IAN FRESHNEY 'SECOND EDITION.CULTURE OF ANIMAL CELLS.A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE' 1987 , ALAN R.LISS, INC. , NEW YORK voir page 187 - page 196</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der 'e Internationale No

PC1/FR 95/01389

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9315185	05-08-93	AU-B- 3596993 AU-B- 3597093 EP-A- 0625007 JP-T- 7504320 WO-A- 9314629 ZA-A- 9300585 ZA-A- 9300586		01-09-93 01-09-93 23-11-94 18-05-95 05-08-93 01-09-93 01-09-93

WO-A-9323528	25-11-93	US-A- 5340740 AU-B- 4375193		23-08-94 13-12-93

WO-A-9001541	22-02-90	AU-B- 623922 AU-B- 4059089 EP-A- 0380646 JP-T- 3503241 US-A- 5166065		28-05-92 05-03-90 08-08-90 25-07-91 24-11-92
